

Coadministração de aminoácidos de cadeia ramificada e lipopolissacarídeo causam quebra da barreira hematoencefálica

Meline O. S. Morais^{a,b}, Emilio L. Streck^{a,b*}

^a *Laboratório de Bioenergética e Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil;*

^b *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brasil*

Numero de palavras: 2.747

Numero de figuras: 2

***Autor para correspondência:** Prof. Dr. Emilio L. Streck, Laboratório de Bioenergética, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma, 88806-000, SC, Brasil. Telefone: + 55 48 3431 2539. Fax: +55 48 3431 2644.

E-mail: emiliostreck@gmail.com

Resumo

A Doença da urina do xarope do bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo causado por uma severa deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, levando ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. Considerando que as infecções desempenham um papel importante no desencadeamento de descompensação metabólica aguda em pacientes com DXB e que os mecanismos subjacentes a neurotoxicidade deste transtorno são pouco compreendidos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da coadministração de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos submetidos a um modelo de DXB sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Ratos Wistar (10 e 30 dias) receberam três injeções de um *pool* de AACR (15.8 mL/g peso corporal) contendo leucina (190mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L) ou salina (grupo controle), em intervalos de uma hora entre as injeções, por via subcutânea. Imediatamente após a primeira administração, os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de LPS (3 mg/kg). Uma hora após a administração dos AACR a integridade da BHE foi avaliada usando o corante de Evan's blue. Nós observamos que a coadministração de AACR e LPS, mas não a administração isolada deles, provoca quebra da BHE no hipocampo e córtex cerebral de ratos neonatos. Por outro lado, em ratos jovens a quebra da BHE ocorre somente no hipocampo. Em conclusão, estes resultados sugerem que o processo inflamatório associado a níveis elevados de AACR provoca um aumento da permeabilidade da BHE. Assim, sugere-se que o colapso da BHE é relevante para a perpetuação da inflamação no cérebro e pode estar relacionada com a disfunção observada em pacientes com DXB.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope do Bordo; aminoácidos de cadeia ramificada; barreira hematoencefálica; lipopolissacarídeo.

Introdução

A Doença da urina do xarope do bordo (DXB; cetoaciduria de cadeia ramificada) é um erro inato do metabolismo de caráter autossômico recessivo causado pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR). Esta deficiência metabólica leva ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, e seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR), ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e ácido α -cetoisovalérico (CIV) (Chuang e Shih 2001).

Embora sequelas neurológicas sejam comuns em pacientes com DXB, os mecanismos do dano cerebral na DXB ainda são pouco compreendidos. Há indícios que a leucina e/ou seu cetoácido sejam os principais metabólitos neurotóxicos na DXB, pois o aumento nas concentrações destes compostos (aproximadamente 5.0 mM) está associado com o surgimento de sintomas neurológicos (Snyderman et al 1964; Chuang e Shih 2001). A Leucina e CIC causam uma complexa síndrome neuroquímica que causa alterações no acúmulo de proteínas, na síntese de neurotransmissores, na regulação do volume celular, crescimento dos neurônios e síntese de mielina. A neurotoxicidade de leucina deriva em parte de sua capacidade de interferir com o transporte de outros grandes aminoácidos neutros através da barreira hematoencefálica (BHE), reduzindo o suprimento de triptofano, metionina, tirosina, fenilalanina, histidina, valina e treonina do cérebro (Gjedde e Crone 1983; Smith e Takasato 1986; Boado et al, 1999; Killian e Chikhale 2001). A deficiência cerebral desses aminoácidos traz consequências adversas para o crescimento do cérebro e para a síntese de certos neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina, e histamina (Kamei et al 1992; Araujo et al 2001; Zinnanti et al 2009). Além disso, severas deficiências de glutamato cerebral, GABA e aspartato tem sido naturalmente observados

em cérebros de vitelos com deficiência de CDCCR e no cérebro post-mortem de um bebê humano com DXB (Prensky e Moser, 1966; Dodd et al 1992). Também, tem sido demonstrado que o acúmulo de metabólitos na DXB produz disfunção bioenergética na mitocôndria (Howeel e Lee 1963; Danner e Elsas 1989; Pilla et al 2003; Sgaravati et al 2003; Ribeiro et al 2008; Amaral et al 2010; de Franceschi et al 2013), apoptose de células neuronais (Jouvet et al 2000), estresse oxidativo (Bridi et al 2003, 2005; Fontella et al 2002; Barschak et al 2006; Mescka et al 2011), aumento da atividade da acetilcolinesterase no cérebro (Scaini et al 2012a) e alteração nos níveis de neurotrofinas (Scaini et al 2012b, 2013).

Sabe-se que a infecção muitas vezes precipita a descompensação aguda com complicações em pacientes com DXB. A maioria dos pacientes morre dentro dos primeiros meses de vida devido à crise metabólica recorrente e deterioração neurológica, muitas vezes precipitada por infecção ou outros estresses, como a vacinação ou cirurgia (Chuang e Shih, 2001). A proteólise do músculo esquelético e o consequente aumento na liberação de aminoácidos na corrente sanguínea, induzida pelo fator de necrose tumoral alfa e outras citocinas, podem ser responsáveis pela descompensação aguda. No entanto, estudos mostram que outros mecanismos podem estar envolvidos no aumento dos níveis de AACR. Holecek e colaboradores (1997) usando CIC marcado mostraram uma diminuição na atividade de CDCCR em fígado perfundido após a administração de endotoxinas de *Salmonella enteritidis* em solução de perfusão. Corroborando com esta hipótese, uma menor atividade de CDCCR pode explicar também um aumento do nível venoso hepático de CIC em seres humanos após a administração de endotoxinas, como foi observado por Fong e colaboradores (1994). Holecek e colaboradores (1998) mostraram que a diminuição da oxidação de CACR e o aumento do fluxo de CACR através da AACR aminotransferase no fígado de ratos tratados com endotoxina, permitem a resíntese de uma quantidade

significante de AACR a partir de CACR levados para o fígado pela corrente sanguínea. Além disso, estudos em animais mostraram que o desequilíbrio de aminoácidos, especialmente excesso de leucina, e a subnutrição possuem efeitos imunossupressores (Marshall et al 1979).

O Lipopolissacarídeo induz a produção acentuada de citocinas, as quais são os principais mediadores das alterações conhecidas como a resposta inflamatória sistêmica (Banks e Erickson 2010). As citocinas e quimiocinas desempenham um papel importante no cérebro durante sua função normal, bem como em estados de doença. Alterações em sua expressão centralmente e/ou periféricamente têm sido mostradas em várias doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer, neuro-AIDS, e em doenças que mostram complicações no sistema nervoso central (SNC), tais como o diabetes (Mrak e Griffin 2001; Marcondes et al 2007; O'Connor et al 2008; Craft 2009; Reale et al 2009), com evidências que sugerem que o evento inflamatório periférico pode promover progressão da doença, assim como agravar a doença (Combrinck et al 2002; Jaeger et al 2009). Em muitas destas condições de doença, alterações nas funções da BHE também são observadas, o que sugere que a interação BHE/sistema imunológico seja importante em um espectro de doenças do SNC.

A BHE surge a partir de junções epiteliais apertadas resultando na aderência do endotélio capilar da microvasculatura cerebral (Abbott 2005). Vários experimentos demonstraram que ocorre aumento da permeabilidade dos capilares cerebrais quando a integridade da membrana celular endotelial é alterada ou pela ativação de rotas bioquímicas específicas envolvidas na regulação e funcionalidade da BHE (Rubin e Staddon 1999; Gonzalez-Mariscal et al 2000). As células inflamatórias podem ser uma fonte significativa de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas potencialmente tóxicas (Schoettle et al 1990; Allan e Rothwell 2005), e alterações na permeabilidade da BHE

podem contribuir para lesão cerebral secundária através da passagem anormal de substâncias do sangue para o SNC influenciando na vulnerabilidade neuronal (Stahel et al 2000; Lucas et al 2006). Neste estudo, nós avaliamos o efeito da coadministração de LPS, principal componente da parede celular das bactérias gram-negativas, em ratos submetidos a um modelo animal de DXB sobre a permeabilidade da BHE.

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar machos de 10 e 30 dias de idade (pesando 20-25 g, e 60-80 g, respectivamente) foram obtidos do biotério central da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Ratos de 10 dias de idade foram deixados com suas mães até o dia do experimento, e os ratos de 30 dias de idade foram desmamados aos 21 dias de vida. Todos os ratos foram colocados em caixas em grupos de cinco com livre acesso a comida e água e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas as 7:00 am) a uma temperatura de $23\pm1^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e das recomendações de Cuidado Animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo número 83/2012).

Administração Aguda de Pool de AACR

Os animais receberam três administrações subcutâneas do pool de AACR (15,8 $\mu\text{L/g}$ peso corporal em intervalos de 1h) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59

mmol/L e valina 69 mmol/L em solução salina (0.85% NaCl) ou solução salina (grupo controle). O pool de AACR e a solução salina foram administrados no dia pós-natal (DP) 10 ou 30 (n=6). Imediatamente após a primeira administração, os animais receberam uma única administração intraperitoneal de LPS (Sigma, St. Louis, MO) dissolvido em salina em uma dose de 3mg/kg de peso corporal (Erickson e Banks 2011). A escolha da dose de AACR e idade dos animais foi baseada em um estudo anterior (Bridi et al 2006) que mostrou que a administração do pool de AACR em ratos (doses e idades semelhantes aos utilizados em nosso estudo) resultou no aumento dos níveis de leucina, isoleucina e valina no sangue e cérebro, mimetizando o principal achado bioquímico observado em pacientes com DXB durante as crises.

Permeabilidade da BHE

A avaliação da permeabilidade da BHE foi realizada utilizando o corante de Evan's blue (peso molecular de 961 Da). Após a última administração do pool de AACR, ratos de 10 dias de idade receberam injeção com 1 mL/kg de Evan's blue a 1% (peso/volume em PBS, intraperitoneal) (Coimbra et al 2007). Adicionalmente, em ratos de 30 dias de idade, o corante foi administrado (2% peso / volume em PBS) por via intravenosa (3 mL/kg) pela veia femoral do rato. Uma hora depois, os animais foram anestesiados com cetamina (6.6 mg/kg), xilazina (0.3 mg/kg) e perfundidos com salina heparinizada (1 U/mL) através do ventrículo esquerdo a uma pressão de 100 mmHg até a obtenção de um líquido de perfusão incolor pelo átrio direito (Belayev et al 1996). As amostras de hipocampo e córtex cerebral foram pesadas e colocadas em solução tricloroacética a 50%. Após a homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3), e foi determinada a fluorescência (excitação a 620 nm e emissão a 680 nm) com um leitor de microplacas M2 Spectramax (Molecular Devices). Os cálculos foram baseados no padrão externo (62,5-500

ng/mL) no mesmo solvente. O teor de Evan's blue do tecido foi quantificado a partir de uma curva padrão derivada de quantidades conhecidas do corante, e foi expressa por grama de tecido (Uyama et al, 1988).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e a média foi utilizada para análise estatística. Os testes para determinação da normalidade e variâncias iguais foram realizados para verificar se nossos dados qualificaram-se para os testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro–Wilk, $p > 0.05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais, $p > 0,05$). Uma análise de uma via da variância, seguida pelo teste de Tukey HSD Post-Hoc foi utilizada para a comparação dos três meios. Diferenças entre os grupos foram consideradas como significativas para $p < 0.05$. Todas as análises foram realizadas em um computador PC IBM-compatível, utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Armonk, New York, USA).

Resultados

No presente estudo, foi avaliada a permeabilidade da BHE através da medida da quantidade de corante Evan's blue no cérebro. A figura 1 mostra que não houve diferença significativa no teor de corante Evan's blue no hipocampo após administração de AACR e LPS, separadamente, em ratos com 10 e 30 dias de idade. No entanto, observamos que a coadministração de AACR e LPS causou ruptura da BHE no hipocampo dos ratos de 10 e 30 dias de idade.

Além disso, não houve diferença significativa no teor de Evan's blue no córtex cerebral após administração de AACR e LPS, isoladamente, em ratos de 10 e 30 dias de idade. Por outro lado, a coadministração de AACR e LPS aumentou a permeabilidade da BHE somente em ratos com 30 dias de idade (Figura 2).

Discussão

A BHE é importante para o SNC, pois suas funções primárias incluem a regulação da passagem de moléculas entre o cérebro e a circulação. A BHE restringe a passagem de moléculas potencialmente nocivas da circulação por meio da expressão das junções intercelulares e redução das taxas de macropinocitose, promovendo a passagem de nutrientes e peptídeos reguladores através da expressão de transportadores (Abbott et al 2010). Neste trabalho, demonstramos que o tecido do cérebro, através do córtex cerebral e do hipocampo, teve uma ruptura da BHE após a administração de AACR em associação com LPS, mas não pela administração isolada dos mesmos.

De Vries e colaboradores (1996) demonstraram que as citocinas, induzem o rompimento da BHE em cultura bovina, indicando que as citocinas ativam as células endoteliais cerebrais para produzirem eicosanóides que, subsequentemente, induzirão a ruptura da BHE. A endotoxina é capaz de ativar células inflamatórias da linhagem mielóide que amplificam a resposta inflamatória e subsequentemente liberam citocinas pró-inflamatórias (Nathan 2002; Tracey 2002). Estas citocinas e moduladores imunológicos podem romper a BHE, e também podem modular a seletividade dos sistemas de transporte saturáveis (Banks 2005). Várias vias podem estar envolvidas no aumento da permeabilidade da BHE durante as condições inflamatórias, tais como o aumento da pinocitose resultando na disfunção das junções apertadas da BHE (Risau e Wolburg 1990;

Huber et al 2002a,b). Além do mais, alterações na expressão das citocinas centralmente e/ou periféricamente, tem sido demonstrado em várias doenças neurodegenerativas incluindo doença de Alzheimer, Neuro-AIDS, bem como as doenças que apresentam complicações do SNC, tais como o diabetes (Banks et al 1999; Mrak e Griffin 2001; Marcondes et al 2007; O'Connor et al 2008; Craft 2009; Reale et al 2009) com evidência sugerindo que eventos inflamatórios periféricos podem promover progressão da doença, assim como agravar a doença (Combrinck et al 2002; Jaeger et al 2009). Em muitos destes estados de doença, alterações na função da BHE também são observadas, sugerindo que a interação BHE/sistema imunológico é importante em um espectro de doenças do SNC. Neste mesmo contexto, Simone e colaboradores (2013) demonstraram que na presença de níveis elevados de AACR, células microgliais exibem um fenótipo peculiar caracterizado por uma inclinação parcial para o estado anti-inflamatório, que pode resultar em uma resposta microglial menos eficiente ao dano local e no estabelecimento de um estado inflamatório de baixo grau.

Alterações na permeabilidade da BHE também pode ser consequência da hiperativação das metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de proteases de zinco e cálcio-dependentes, extracelulares que degradam a matriz extracelular e outras proteínas extracelulares (Romanic et al 1998; Gidday et al 2005). A ativação das MMPs é essencial para remodelação do espaço extracelular do tecido, morfogênese e cicatrização das feridas (Page-McCaw et al 2007). Entretanto, a atividade proteolítica excessiva das MMPs também pode ser prejudicial em componentes de degradação da matriz extracelular, levando a dano microvascular progressivo, incluindo hemorragia (Rosenberg e Navratil 1997; Gidday et al 2005). Em doenças inflamatórias, as MMPs parecem desenvolver um papel fundamental na quebra da BHE (Leib et al 2000; Dal-Pizzol et al 2013).

Além disso, em modelos animais tem sido demonstrada uma correlação entre o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da resistência elétrica do endotélio cerebral, o que indica um aumento na permeabilidade da BHE. Espécies reativas de oxigênio (EROs) também fornecem um gatilho comum para muitas vias que mediam diretamente a ruptura da BHE, como dano oxidativo, modificação da junção apertada e ativação de MMPs (Pun et al 2009). Por outro lado, EROs estão associadas com dano na enzima ATP-ase, que promove uma disfunção da BHE, isso permite que ocorra o influxo de Ca^{+2} para dentro das células (Olesen et al 1987; Pun et al 2009). Corroborando com esta hipótese, o acúmulo de CIC foi demonstrado anteriormente como inibidor do metabolismo oxidativo através da inibição da piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase resultando na disfunção do Ciclo de Krebs, e esta falha de energia resulta na perda da função da Na^+/K^+ -ATPase levando a um inchaço celular e edema cerebral (Zinnanti et al 2009). Além disso, uma das principais características da DXB é um aumento da produção de EROs nos órgãos afetados, incluindo o cérebro (Bridi et al 2003, 2005; Fontella et al 2002; Barschak et al 2006; Mescka et al 2011).

Os mecanismos celular e bioquímico das alterações da BHE nos ratos submetidos à administração de AACR em combinação com LPS ainda são pouco conhecidos. O LPS tem sido demonstrado como um causador de ruptura na BHE *in vitro* e *in vivo* (De Vries et al 1996; Xaio et al 2001; Singh e Jiang 2004). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que as administrações de LPS sozinho não causou aumento significativo na permeabilidade da BHE para o corante Evan's blue. Estes resultados são compatíveis com os dados que indicam que o tratamento dos ratos com uma dose baixa de LPS (3 mg/kg) compromete parcialmente a integridade da BHE, sem perturbar a estrutura capilar (Bickel et al 1998; Serres et al 2009). Todavia, a administração de AACR e LPS isoladamente pode causar a quebra da BHE, causando um aumento da permeabilidade apenas para

pequenas moléculas, mas não necessariamente está associada com a ruptura estrutural. Por outro lado, nós propomos que a administração de AACR em combinação com LPS causa rompimento da BHE associado à ruptura estrutural, sugere-se uma ação sinérgica entre AACR e LPS. Considerando o conjunto, nós podemos sugerir que o LPS potencializa os efeitos do AACR sobre a permeabilidade da BHE levando a produção de citocinas e estresse oxidativo, possivelmente por hiperativação das MMPs.

Em conclusão, este resultado sugere que a quebra da BHE é relevante para a perpetuação da inflamação no cérebro e pode estar relacionada com a disfunção cerebral observada em pacientes com DXB. A infecção precipita frequentemente a descompensação aguda com complicações, não só através da proteólise do músculo esquelético e efeitos imunossupressores dos AACR, mas também pela ruptura da BHE, uma vez que o aumento da permeabilidade da BHE permite uma maior entrada de AACR e outras substâncias neurotóxicas para o SNC.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Abbott NJ (2005) Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25:5–23.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25
- Allan SM, Rothwell NJ (2005) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 358:1669–1677
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M (2010) Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res* 1324:75–84
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K et al (2001) Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38:529–537
- Banks WA, Erickson MA (2010) The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis* 37:26–32
- Banks WA (2005) Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des* 11:973–84
- Banks WA, Kastin AJ, Brennan JM, Vallance KL (1999) Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood-brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. *Exp Neurol* 156:165–171
- Barschak AG, Sitta A, Deon M et al (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 21:279–286
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research* 739:88–96

- Bickel U, Grave B, Kang YS, del Rey A, Voigt K (1998) No increase in blood-brain barrier permeability after intraperitoneal injection of endotoxin in the rat. *J Neuroimmunol* 85:131-136
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12079–12084
- Breimer DD, Kuiper J (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 64:37–43
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB et al (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21:327–332
- Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V et al (2006) A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods* 155:224-230
- Bridi R, Latini A, Braun CA et al (2005) Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39:71–79
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1971–2005
- Coimbra RS, Loquet G, Leib SL (2007) Limited efficacy of adjuvant therapy with dexamethasone in preventing hearing loss due to experimental pneumococcal meningitis in the infant rat. *Pediatr Res* 62: 291–294
- Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002) Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112:7–11

- Craft S (2009) The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol* 66:300–305
- Dal-Pizzol F, Rojas HA, dos Santos EM et al (2013) Matrix Metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol* doi 10.1007/s12035-013-8433-7
- Danner DJ, Elsas LJ (1989) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, pp 671–692
- de Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP et al (2013) Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 38:632–43
- de Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C et al (2013) Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta* 1832:650–659
- de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood– brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 64:37– 43
- Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL et al (1992) Glutamate and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem* 59:582–590
- Erickson MA, Banks WA (2011) Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behavior Immunity* 25:1637–1648

- Fong Y, Matthews DE, He W, Marano MA, Moldawer LL, Lowry SF (1994) Whole body and splanchnic leucine, phenylalanine, and glucose kinetics during endotoxemia in humans. *Am J Physiol* 266:R419–R425
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolni V et al (2002) Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17:47–54
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is pro-inflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H558–568
- Gjedde A, Crone C (1983) Biochemical modulation of blood-brain barrier permeability. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 8:59–74
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315–324
- Holecek M, Sprongl L, Skopec F, Andrýs C, Pecka M (1997) Leucine metabolism in TNF- α - and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *American Journal of Physiology* 273:E1052-1058
- Holecek M, Sprongl L, Tichý M, Pecka M (1998) Leucine metabolism in rat liver after a bolus injection of endotoxin. *Metabolism* 47:681-685
- Howell RK, Lee M (1963) Influence of α -keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 113:660–663
- Huber JD, Hau VS, Borg L, Campos CR, Eggleton RD, Davis TP (2002a) Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1531–H1537, 2002a.

- Huber JD, Hau VS, Mark KS, Brown RC, Campos CR, Davis TP (2002b) Viability of microvascular endothelial cells to direct exposure of formalin, lambda-carrageenan, and complete Freund's adjuvant. *Eur J Pharmacol* 450:297–304
- Jaeger LB, Dohgu S, Sultana R et al (2009) Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* 23:507–17
- Jouvet J, Rustin P, Taylor DL et al (2000) Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: Implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 11:1919–1932
- Kamei A, Takashima S, Chan F, Becker LE (1992) Abnormal dendritic development in maple syrup urine disease. *Pediatr Neurol* 8:145–147
- Killian DM, Chikhale PJ (2001) Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci Lett* 306:1–4
- Kuhlmann CRW, Tamaki R, Gamberdinger M et al (2007) Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *J Neurochem* 102:501–507
- Lagrange P, Romero IA, Minn A, Revest PA (1999) Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 27:667–672
- Land JM, Mowbray J, Clark JB (1976) Control of pyruvate and L-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem* 26:823–830

- Leib SL, Leepert D, Clements J, Tauber MG (2000) Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 68:615–620
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Brit J Pharmacol* 147:S232–240
- Marcondes MC, Burdo TH, Sopper S et al (2007) Enrichment and persistence of virus-specific CTL in the brain of simian immunodeficiency virus-infected monkeys is associated with a unique cytokine environment. *J Immunol* 178:5812–5819
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biol Med* 23:134–147
- Marshall JR, Gracy RW, Kester MV (1979) Maple syrup urine disease Response to dietary modifications. *Journal of the American Osteopathic Association* 79:98
- Mescka C, Moraes T, Rosa A et al (2011) In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 26:21-28
- Mrak RE, Griffin WS (2001) Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:903–908
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846–852
- O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW (2008) Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol* 252:91–110
- Olesen SP (1987) Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta Physiol Scand* 129:181-187
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221–233

- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res* 28:675–679
- Prensky AL, Moser HW (1966) Brain lipids, proteolipids, and free amino acids in maple syrup urine disease. *J Neurochem* 13:863–74
- Pun PB, Lu J, Moochhala S (2009) Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* 43:348-64
- Reale M, Greig NH, Kamal MA (2009) Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mini Rev Med Chem* 9:1229–1241
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa R et al (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114–124
- Risau W, Wolburg H (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13: 174-178
- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020–1030
- Rosenberg GA, Navratil M (1997) Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 48:921–92
- Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22:11–28
- Scaini G, de Rochi N, Jeremias IC (2012a) Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol* 45:279-86

- Scaini G, Comim CM, Oliveira GM et al (2012b) Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model. *J Inherit Metab Dis*. doi 10.1007/s10545-012-9549-z
- Scaini G, Mello-Santos LM, Furlanetto CB et al (2013) Acute and Chronic Administration of the Branched-Chain Amino Acids Decreases Nerve Growth Factor in Rat Hippocampus. *Mol Neurobiol*. doi 10.1007/s12035-013-8447-1
- Schoettle RJ, Kochanek PM, Magargee MJ, Uhl MW, Nemoto EM (1990) Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *J Neurotrauma* 7:207–217
- Serres S, Anthony DC, Jiang Y et al (2009) Systemic inflammatory response reactivates immune-mediated lesions in rat brain. *J Neurosci* 29:4820-8
- Sgaravati AM, Rosa RB, Schuck PF et al (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639:232–238
- Singh AK, Jiang Y (2004) How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201:197–207
- Smith QR, Takasato Y (1986) Kinetics of amino acid transport at the blood-brain barrier studied using an in situ brain perfusion technique. *Ann N Y Acad Sci* 481:186–201
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt Jr LE (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34:454–472.
- Stahel PF, Shohami E, Younis FM et al (2000) Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intra-cranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:369–380
- Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature* 420:853–859

- Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M (1988) Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using evans blue fluorescence. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 8:282–284
- Xaio H, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE (2001) Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res* 896:36-42
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K et al (2009) Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain* 132:903–18

Figuras

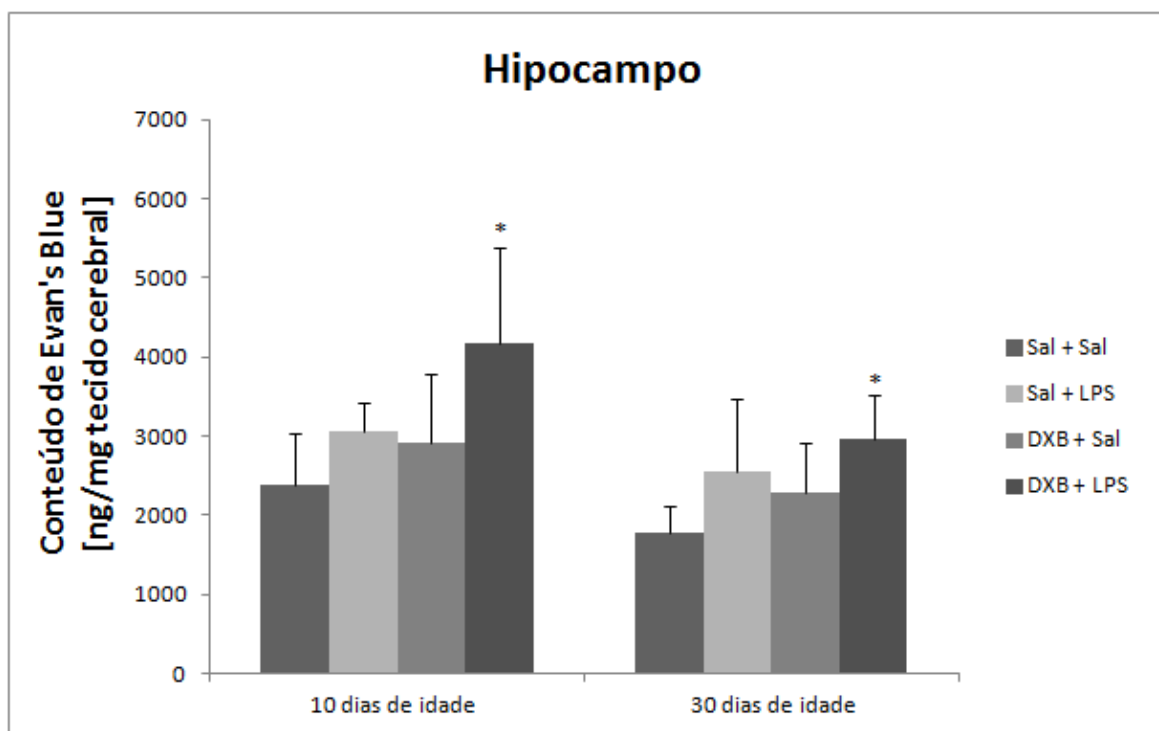


Figura 1: Efeito da administração aguda de AACR, lipopolissacarídeo (LPS), ou uma combinação destes na integridade da barreira hematoencefálica no hipocampo de ratos, 10 e 30 dias de idade. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de seis a sete animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo de controle.

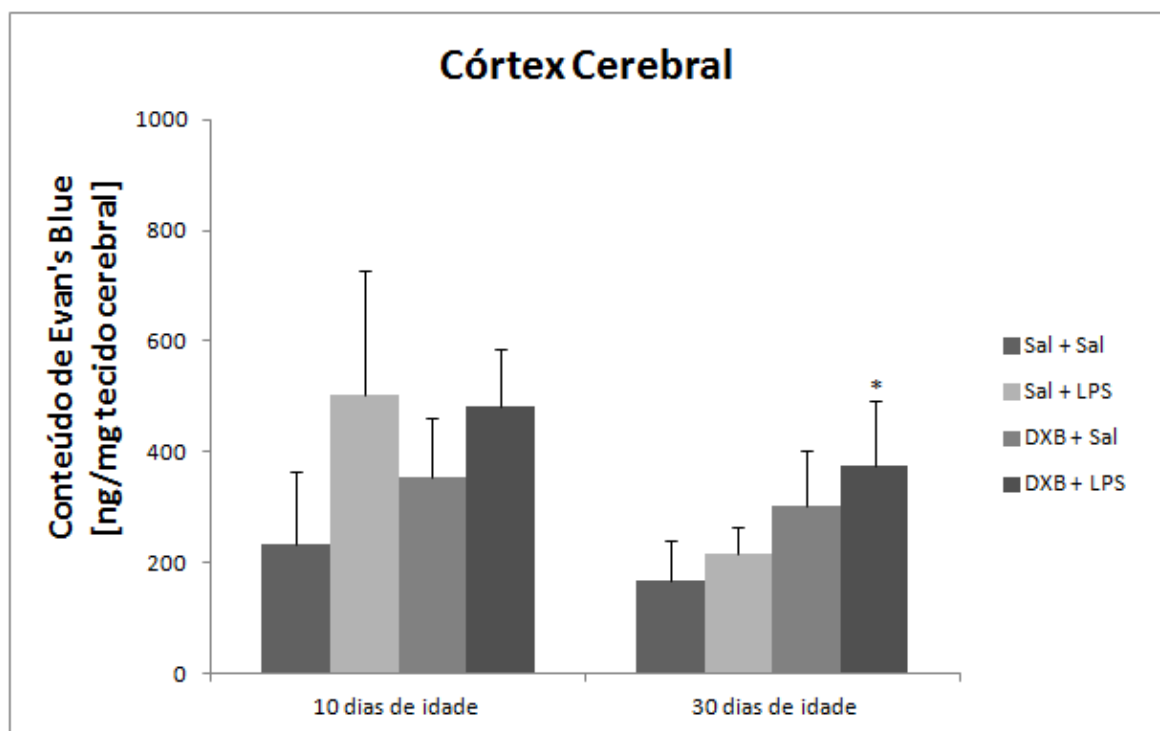


Figura 2: Efeito da administração aguda de AACR, lipopolissacarídeo (LPS), ou uma combinação destes na integridade da barreira hematoencefálica no córtex cerebral de ratos, 10 e 30 dias de idade. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de seis a sete animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo de controle.